

**Selective ELISA determ. of anti-cardiolipin antibodies - which differentiates antibodies against cardiolipin-beta-2- glycoprotein-1 complex, for diagnosis of auto:immune diseases**

**Patent number:** DE4241330  
**Publication date:** 1994-06-09  
**Inventor:** LAUER SABINE DR (DE)  
**Applicant:** LAUER SABINE DR (DE)  
**Classification:**  
- **international:** G01N33/535; C12Q1/28; C07K15/28  
- **european:** G01N33/564, G01N33/92  
**Application number:** DE19924241330 19921208  
**Priority number(s):** DE19924241330 19921208

**Abstract of DE4241330**

Conventional determ. of anticardiolipin antibodies (Ab) by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) involves (1) immobilising cardiolipin (I) on polystyrene microtitre plates; (2) blocking residual binding sites; (3) incubation with patient sample; (4) detecting Ab-(I) with peroxidase-labelled anti-human Ab(IgG or IgM) and colour development from enzyme substrate; (5) quantifying Ab from the measured dye extinction.

This method is modified to permit differentiation between Ab directed against (I) and those against the (I)/beta2-glycoprotein 1 (bGM) complex. This involves (a) after coating wells with (I) at 30 micrg/well blocking with a soln. of either 1% bovine serum albumin (BSA) and human bGP1 (50 micrg/well) or 1% BSA and 20% adult bovine serum (contg. the bovine equiv. of bGM), these solns. are also used for sample dilution; (b) removing autologous bGP1 from the sample with heparin-Sepharose and (c) subtraction of a blank value from the measured extinction.

USE/ADVANTAGE - This method is used for diagnosis of autoimmune diseases (associated with presence of anti-(I) Ab). The method is specific for anti-(I) Ab, avoiding confusion with anti-complex Ab (which are associated with thrombo-embolic disorders). The correction with a blank reading accounts for non-specific binding. The method is suitable for early diagnosis.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**



DEUTSCHES  
PATENTAMT

② Aktenzeichen: P 42 41 330.3  
② Anmeldetag: 8. 12. 92  
④ Offenlegungstag: 9. 6. 94

DE 42 41 330 A 1

⑦ Anmelder:  
Lauer, Sabine, Dr., O-8019 Dresden, DE

⑦ Erfinder:  
gleich Anmelder

⑤ Testverfahren zur Differenzierung von gegen Cardiolipin (Anticardiolipin-Antikörper) und gegen einen Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein I gerichteten Antikörpern

⑤ Das Patent beinhaltet

- die Entfernung von autologem  $\beta$ 2-Glykoprotein I aus Seren oder Plasmen für deren Einsatz im ELISA zur Differenzierung von gegen Cardiolipin (Anticardiolipin Antikörper) und gegen einen Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein I gerichteten Antikörpern,
  - die Durchführung des ELISA zur Differenzierung von gegen Cardiolipin (Anticardiolipin Antikörper) und gegen einen Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein I gerichteten Antikörpern in zwei Varianten, sowie
  - eine Auswertemethode für den ELISA, welche die unspezifische Bindung der einzelnen Proben ausschließt.
- Das Patent kann als Testbesteck entwickelt, gewerblich vertrieben und differential- oder auch frühdiagnostisch in klinischen Laboratorien eingesetzt werden.

DE 42 41 330 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung im Bereich der Biotechnologie ist als Spezifizierung und somit Verbesserung der Diagnostik von Antikörpern gegen Cardiolipin zu bewerten.

Derzeit verwendete kommerzielle Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Anticardiolipin Antikörpern erlauben keine Unterscheidung von Antikörpern gegen Cardiolipin und Antikörpern gegen den Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein 1. Außerdem findet die unspezifische Bindung der einzelnen Proben, die in der Größenordnung der spezifischen Bindung liegen kann, keine Berücksichtigung bei der Auswertung (Testbegleitschriften der Firma ELIAS Medizintechnik GmbH, Freiburg und Firma LD Labordiagnostik GmbH, Hagen). Festlegungen eines internationalen Workshops zur Standardisierung des Testes zur Bestimmung von Anticardiolipin Antikörpern [Harris E.N., A.E. Gharavi, S.P. Patel and G.R.V. Hughes. (1987). Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held April 4, 1986. Clin. Exp. Immunol. 68, 215—222.] erlaubt die Verwendung von 10% Fetalem Kälberserum, 10% Adultem Rinderserum, 1% Rinderserumalbumin oder 1.5% Rinderserumalbumin/0.3% Gelatine als Blockierungs- und Verdünnungsmedium und die Subtraktion von Blankwerten, welche die individuelle unspezifische Bindung der einzelnen Proben ausschließt, wird nicht gefordert.

Phospholipidbindende Antikörper (Anticardiolipin Antikörper und Lupus Antikoagulans) werden heute entsprechend den zu ihrem Nachweis verwendeten Testverfahren (Anticardiolipin Antikörper mittels ELISA; Lupus Antikoagulans durch einen phospholipidabhängigen Gerinnungstest z. B. PTT, APTT, KCT, RVVT) oder nach ihrem Auftreten bei bestimmten Krankheitsbildern (im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten oder selbständig als Primäres Antiphospholipidsyndrom, welches sich durch wiederholt auftretende Thrombosen oder Embolien unklarer Genese auszeichnet, klassifiziert. Eine positive Korrelation von IgG-Anticardiolipin Antikörpern, die Lupus Antikoagulans Aktivität zeigten, und thrombo-embolischen Komplikationen wurde vielfach nachgewiesen. Beim Nachweis von Anticardiolipin und Lupus Antikoagulans Antikörpern wurden unter Verwendung der verschiedenen Tests häufig Überschneidungen gefunden (bestimmte Anticardiolipin Antikörper zeigten Lupus Antikoagulans Aktivität im Gerinnungstest und bestimmte Lupus Antikoagulans Antikörper zeigten eine positive Reaktion im ELISA). Andererseits wurde die Eigenständigkeit von Anticardiolipin und Lupus Antikoagulans Antikörpern durch deren Separierung aus Plasmen, die beide Arten der phospholipidbindenden Antikörpern enthielten, gezeigt (McNeil H.P., C.N. Chesterman and S.A. Crilis. (1989). Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. Br. J. Haematol. 73, 506—513). Anticardiolipin Antikörper wurden als solche definiert, die positiv im ELISA und negativ im Gerinnungstest waren, Lupus Antikoagulans Antikörper waren entsprechend im EUSA negativ. Infolge der erwähnten Überschneidungen war es naheliegend, daß es eine dritte Gruppe von Antikörpern gibt, die in beiden Tests eine positive Reaktion zeigt. Diese Gruppe von Anticardiolipin Antikörpern mit Lupus Antikoagulans Aktivität binden an einen Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 und können schnell mit dem beschriebenen Testverfahren angezeigt werden.

Das Verfahren kann als Testbesteck entwickelt und für eine spezifizierte Diagnostik von Anticardiolipin-Antikörpern im klinischimmunologischen Labor angewendet werden. Es erlaubt die Unterscheidung von Anticardiolipin Antikörpern, die im Rahmen von Autoimmunerkrankungen auftreten von solchen die mit den beschriebenen Gerinnungsstörungen verbunden sind. Der Test könnte frühdiagnostische Bedeutung besitzen, da Anticardiolipin und Lupus Antikoagulans Antikörper häufig lange Zeit vor Eintreten einer Thrombose oder Embolie nachgewiesen wurden.

## Vorbehandlung von Seren/Plasmen

Komplement in Seren/Plasmen darf nicht durch Hitze (30 min., 56°C) inaktiviert werden. Adsorption von autologem  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 in Seren/Plasmen durch heparinaktivierte Sepharose: 1 g heparinaktivierte Sepharose ist in 200 ml Bindungspuffer für mindestens 15 min. zu quellen und anschließend für weitere 15 min. zu rühren. Danach wird die Suspension über eine Glasfilternutsche (Por 40) abgesaugt und für ca. 10 min. mit Bindungspuffer gewaschen. Nachdem die Flüssigkeit weitestgehend entfernt ist, werden 0.1 g dieses Materials zu 1 ml des 1 : 100 verdünnten (10 mM Phosphatpuffer, 0.125M NaCl/1% Rinderserumalbumin) Serums/Plasmas gegeben und über Nacht bei 4°C stehengelassen. Vor Einsatz der Seren/Plasmen im ELISA werden diese zentrifugiert (10 min., 3000 g). Die Heparinsepharose kann durch einstündige Einwirkung des Ablösepuffers regeneriert und nach gründlichem Waschen mit Bindungspuffer erneut verwendet werden. Dem Bindungspuffer sollte zur Aufbewahrung der heparinaktivierten Sepharose bei 4°C Thiomersal (0.1%) zugesetzt werden.

Bindungs- und Ablösepuffer:	1.09 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0.53 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Binden:	2.92 g NaCl
Ablösen:	58.50 g NaCl
mit destilliertem Wasser jeweils auf 1000 ml, pH 7.2.	

## ELISA zur Differenzierung von Anticardiolipin Antikörpern

1. Beschichten von Polystyrol Mikrotiterplatten (96 Kavitäten, F-Form, polysorb, Fa. Nunc)

In eine Hälfte der Kavitäten (A—H 6-12) von Mikrotiterplatten werden 40  $\mu$ l einer ethanolschen Lösung von

Cardiolipin (0.75 mg/ml) g Cardiolipin/Kavität), in die andere Hälfte (A -6) 40 µl; Ethanol (Blankwerte) gegeben. Zur Beschichtung werden die Platten über Nacht bei Raumtemperatur unter Wasserstrahlpumpenvakuum in einem mit Blaugel (Trockenmittel) bestückten Exsikkator belassen.

## 2. Waschen

5

Die einzelnen Kavitäten sind zweimal mit 10 mM Phosphatpuffer, 0.125 M NaCl zu waschen.

## 3. Blockierung freier Bindungsstellen

10

Eine Hälfte (A—H 1-3 und A—H 6-9) der mit Ethanol und Cardiolipin beschichteten Kavitäten ist mit jeweils 100 µl humanem  $\beta$ 2-Glykoprotein I (0.5 mg/ml) oder 20% Adultem Rinderserum in 10 mM Phosphatpuffer, 0.1 M NaCl, die andere (A—H 4-6 und A—H 7-12) mit 1% Rinderserumalbumin (jeweils in 10 mM Phosphatpuffer, 0.1 M NaCl) zu bestücken und für 2 h bei 22°C zu inkubieren.

## 4. Waschen

15

Die einzelnen Kavitäten sind dreimal mit 10 mM Phosphatpuffer, 0.125 M NaCl zu waschen.

## 5. Inkubation mit Patientenproben

20

100 µl der verdünnten und an heparinaktivierter Sepharose inkubierten Seren/Plasmen sind mindestens in Doppelansätzen für 2 h bei 22°C zu inkubieren.

## 6. Waschen

25

Die einzelnen Kavitäten sind dreimal mit 10 mM Phosphatpuffer, 0.125 M NaCl zu waschen.

## 7. Inkubation mit konjugierten Antikörpern

30

Peroxidase-konjugiertes Ziege-Anti-Human-IgG ist entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Vorgaben in 10 mM Phosphatpuffer, 0.1 M NaCl 1% Rinderserumalbumin zu verdünnen. 100 µl der Konjugatlösung ist in die Kavitäten der Mikrotiterplatte zu geben und für 1.25 h bei 22°C zu inkubieren.

## 8. Waschen

35

Die einzelnen Kavitäten sind dreimal mit 10 mM Phosphatpuffer, 0.125 M NaCl zu waschen.

## 9. Substratinkubation und Messen der Extinktionen

40

Zur Entwicklung des Testes sind 100 µl Substratlösung [6 mg OPD in 15.0 ml Substratpuffer und 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)] in jede Kavität zu geben und für 30 Min. bei 22°C im Dunkeln zu inkubieren. Nach Abbruch der Reaktion durch 100 µl 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sind die Extinktionen bei 492 nm mittels ELISA-Reader zu messen.

### Substratpuffer:

45

3.645 ml 0.1 M Zitronensäure

3.855 ml 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

7.5 ml destilliertes H<sub>2</sub>O

### Phosphatpuffer:

50

1.09 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.53 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5.84 g NaCl (0.1 M)

7.30 g NaCl (0.125 M)

mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 1000 ml, pH 7.2.

55

Von den Blank- und Probenmewerten ist der Durchschnittswert zu bestimmen. Der korrigierte Probenwert, welcher die individuelle unspezifische Bindung der einzelnen Seren ausschliet, ergibt sich durch Subtraktion der Blankwerte von den entsprechenden Probenmewerten. Als Negativkontrolle wurde ein Serumpool von Anticardiolipin Antikörper negativen Blutspendern (Normalserumpool) mitgeführt. Der negativ-positiv-Grenzwert ergibt sich durch Addition der dreifachen Standardabweichung der im Normalserumpool vereinigten Seren zu dem Probenwert des Normalserumpools, welcher auf jeder Platte zu bestimmen ist. Die Standardabweichung wurde mit 0.069 unter Verwendung von 223 Normalseren ermittelt.

65

## Beispiele

Tabelle 1

Vergleich der Extinktionen Anticardiolipin Antikörper-positiver Seren von Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern gegen den Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 (E1) und gegen Cardiolipin (E2).

Bei den mit Stern gekennzeichneten Seren wurde gerinnungsanalytisch ein Lupus Antikoagulans nachgewiesen.

Ein Quotient (E1/E2) von  $\gg 1$  ist Indikator für Antikörper gegen den Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein I.

Serum	E1	E2	E1/E2
Syphilisseren			
1	0.126	0.374	0.33
2	0.458	0.962	0.47
3	0.949	0.912	1.04
4	0.274	1.139	0.24
5	0.400	0.846	0.47
PBC-Seren			
1	1.205	1.076	1.12
2	0.335	0.665	0.50
3	0.300	0.713	0.42
Seren mit habituellem Abort			
1	0.729	1.588	0.46
2	0.284	1.231	0.23
3	0.311	1.400	0.22
4	0.761	1.465	0.52
5*	1.369	0.271	5.05
6*	1.588	0.252	6.30
7*	1.136	0.210	5.41

Serum	E1	E2	E1/E2
-------	----	----	-------

Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen:

5

1	0.402	0.630	0.64
2	0.629	1.461	0.43
4	0.833	1.500	0.55
5	0.377	1.209	0.31
6	0.296	1.005	0.29
7	0.894	1.477	0.60
8	0.722	1.477	0.48
9	0.208	1.403	0.14
10	0.152	0.847	0.18
11	0.567	1.485	0.38
12	0.233	1.322	0.18
13	0.162	0.923	0.17
14	0.555	1.301	0.43
15	0.044	0.508	0.08
16	0.901	1.589	0.57
17	0.493	1.410	0.35
18	0.665	1.509	0.44
19	0.263	1.226	0.21
20	0.210	1.114	0.19
21	0.322	1.134	0.28

10

15

20

25

30

35

40

Seren von Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes:

45

1	0.144	0.788	0.18
2	0.164	0.665	0.25
3	1.121	1.126	0.99
4	0.162	0.595	0.27
5	0.427	0.684	0.62
6	0.202	0.354	0.57
7	0.886	0.872	1.01
8	0.297	0.571	0.52
9	0.728	0.310	2.35
10	0.286	0.421	0.68

60

65

Tabelle 2

Vergleich der Extinktionen im ELISA unter Verwendung von 20% Adultem Rinderserum (ABS), 20% Fetalem Kälberserum (FCS), 1% Rinderserumalbumin (RSA) und  $\beta$ 2-Glykoprotein I zum Blockieren der festen Phase

Serum	20% ABS	GPI	20% FCS	1% RSA
Seren mit Quotient >> 1 (GPI essentiell)				
habitueLLer Abort 5*	1.263	1.321	1.075	0.248
habitueLLer Abort 6*	1.488	1.534	1.251	0.234
habitueLLer Abort 7*	1.201	1.169	0.953	0.214
SLE 9	0.734	0.765	0.609	0.270
Seren mit Quotient von etwa 1				
PBC 1	1.216	1.167	1.169	1.146
SLE 7	0.907	0.895	0.873	0.882
Syphilis 3	0.934	0.956	0.922	0.928
Seren mit Quotient < 1				
SD-ANA neg. 4	0.862	0.902	0.867	1.531
SD-ANA pos. 9	0.217	0.200	0.234	1.383
habitueLLer Abort 4	0.744	0.761	0.795	1.405

#### Patentanspruch

Die Bestimmung von Anticardiolipin-Antikörpern im Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) erfolgt mit adsorbtiv an der Oberfläche von Polystyrol-Mikrotiterplatten gebundenem Cardiolipin. Nach Blockierung von an der Oberfläche verbliebenen freien Bindungsstellen, die mit Lösungen von Rinderserumalbumin, Fetalem Kälberserum oder anderer Proteine erfolgen kann, wird mit Patientenproben inkubiert. Darin enthaltene Anticardiolipin-Antikörper binden spezifisch an Cardiolipin und werden anschließend mit peroxidasemarkierten Anti-Human-Antikörpern (IgG oder IgM) nachgewiesen. Die Enzym-Substratreaktion ist mit einer Farbstoffbildungsreaktion gekoppelt. Auf Grund der Proportionalität von gebildetem Farbstoff und der durch Cardiolipin gebundenen Anticardiolipin-Antikörper erfolgt deren Quantifizierung durch Messen der Extinktionen im Absorptionsmaximum des Farbstoffes. Der beschriebene Assay erlaubt keine Differenzierung von Anticardiolipin-Antikörpern.

Testverfahren zur Differenzierung von gegen Cardiolipin (Anticardiolipin-Antikörper) und gegen einen Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 gerichteten Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß

1. nach Beschichtung mit Cardiolipin (30  $\mu$ g/Kavität) im Blockierungsschritt und zur Verdünnung der Seren/Plasmen folgende Proteinlösungen verwendet werden:

1.1 1% Rinderserumalbumin und humanes  $\beta$ 2-Glykoprotein I (50  $\mu$ g/Kavität) oder

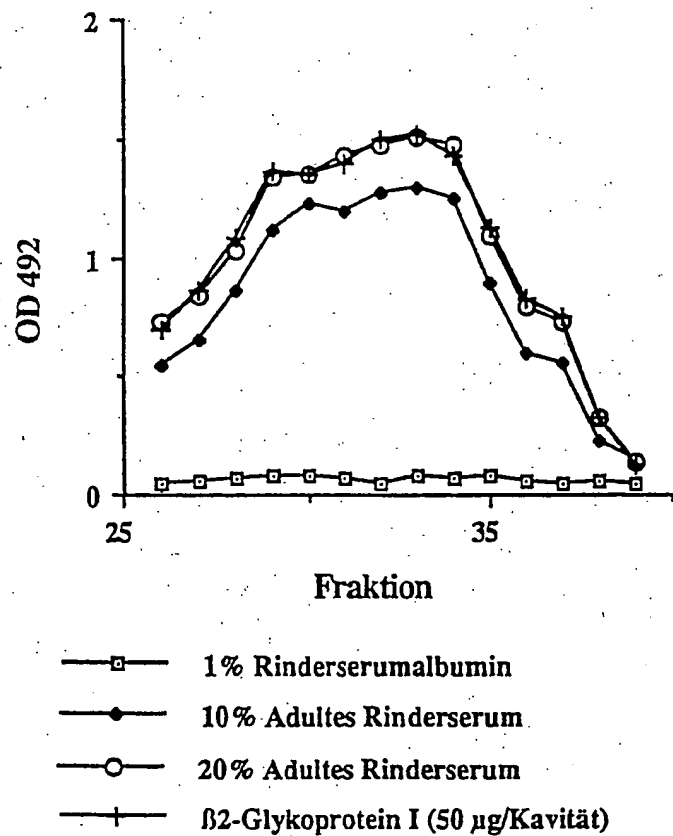
1.2 1% Rinderserumalbumin und 20% Adultes Rinderserum (enthält  $\beta$ 2-Glykoprotein I-äquivalent des Rindes);

2. die Entfernung von autologem  $\beta$ 2-Glykoprotein I aus Patientenseren oder -plasmen durch Inkubation mit Heparinsepharose erfolgt;

3. die Subtraktion von Blankwerten einer jeden Probe in der Auswertung Berücksichtigung findet.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Abbildung 1: Untersuchung von affinitätsgereinigten Fraktionen eines Serums mit Antikörpern gegen den Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein I mit 10 und 20% Adultem Rinderserum, 1% Rinderserumalbumin und  $\beta$ 2-Glykoprotein I im ELISA. (zeigt, daß  $\beta$ 2-Glykoprotein I durch 20% Adultes Rinderserum ersetzt werden kann). OD 492=Extinktion bei 492 nm.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ ~~BLACK BORDERS~~
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**